

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-211888

(43)Date of publication of application : 24.08.1993

(51)Int.Cl.

C12P 21/08
C12N 5/20
G01N 33/53
G01N 33/577
// A61K 39/395
A61K 39/395
C07K 15/06
C12N 15/06
C12P 21/08
C12R 1:91)

(21)Application number : 03-008454

(71)Applicant : KISHIMOTO CHUZO
CHUGAI PHARMACEUT CO LTD
TOSOH CORP

(22)Date of filing : 28.01.1991

(72)Inventor : SAITO TAKASHI
KISHIMOTO CHUZO
SUZUKI HIROSHI
YASUKAWA KIYOSHI

(54) ANTIBODY TO MURINE INTERLEUKIN-6 RECEPTOR AND ITS USE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject antibody, specifically bindable to a murine interleukin-6 receptor and useful for elucidating various properties of the murine interleukin-6 receptor, a therapeutic agent for abnormal production and immunoassay thereof, etc., in relation to the murine interleukin-6 receptor.

CONSTITUTION: A murine interleukin-6 receptor is used as an immunogen and administered to immunologically sensitize a mammal. After the final immunization, the whole blood is collected. Blood serum is then separated from the collected blood and an antibody is further isolated from the separated blood serum according to a conventional method. Thereby, a polyclonal antibody capable of recognizing the murine interleukin-6 receptor is obtained. A splenic cell is collected from the mammal after the final immunization, fused to a cellular strain of a myeloma and selectively cultured in a culture medium to afford a fused strain. A strain capable of recognizing the murine interleukin-6 receptor is then cloned from the fused strain and the monocloned fused strain is cultured. The resultant product is subsequently separated from the culture to provide the objective monoclonal antibody to the murine interleukin-6 receptor.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 19.12.1997

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]	3047926
[Date of registration]	24.03.2000
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]	
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]	
[Date of extinction of right]	

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-211888

(43)公開日 平成5年(1993)8月24日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
C 1 2 N 5/20				
G 0 1 N 33/53	P	8310-2 J		
		7236-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		8931-4B	15/ 00	C

審査請求 未請求 請求項の数14(全 6 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平3-8454	(71)出願人	000157865 岸本 忠三 大阪府富田林市中野町 3 丁目 5 番31号
(22)出願日	平成3年(1991)1月28日	(71)出願人	000003311 中外製薬株式会社 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号
		(71)出願人	000003300 東ソー株式会社 山口県新南陽市開成町4560番地
		(72)発明者	斎藤 貴司 神奈川県中郡大磯町石神台 1 - 5 - 9
		(74)代理人	弁理士 青木 朗 (外 4 名)

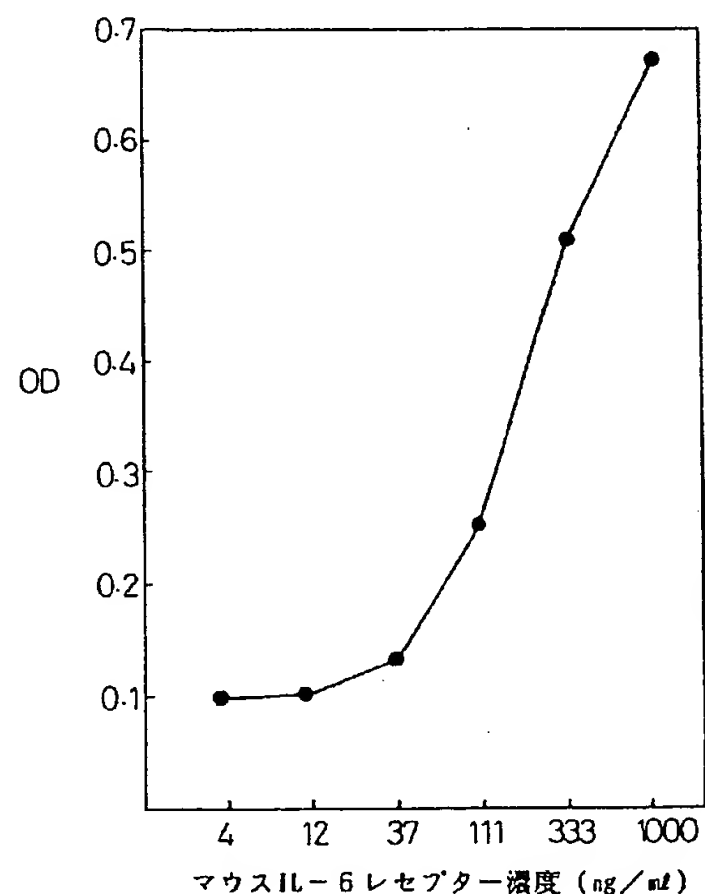
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 マウスインターロイキン-6レセプターに対する抗体及びその使用

(57)【要約】

【構成】本発明は、マウスインターロイキン-6に対するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体に関する。このモノクローナル抗体には、マウスインターロイキンとインターロイキンレセプターとの結合を阻害するものと阻害しないものがある。

【効果】上記抗体は、マウスインターロイキン-6レセプターの諸性質の解明のために有用であり、さらに、インターロイキン-6の異常産生が病因因子であると考えられる種々の自己免疫疾患の治療等の開発のために有用である。さらには、マウスインターロイキン-6レセプターの免疫測定のために有用である。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 マウスIL-6レセプターと特異的に結合し得る抗マウスIL-6レセプター抗体。

【請求項2】 モノクローナル抗体である請求項1に記載の抗体。

【請求項3】 マウスIL-6レセプターとの結合についてマウスIL-6あるいはヒトIL-6と競合する請求項2に記載の抗体。

【請求項4】 RS13である請求項3に記載の抗体。

【請求項5】 マウスIL-6レセプターとの結合についてマウスIL-6及びヒトIL-6のいずれとも競合しない、請求項2に記載の抗体。

【請求項6】 RS15である請求項5に記載の抗体。

【請求項7】 ポリクローナル抗体である請求項1に記載の抗体。

【請求項8】 請求項2に記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

【請求項9】 マウスIL-6レセプター抗原により哺乳類を感作し、該免疫細胞をミエローマ細胞株と融合せしめ、そして該融合株からマウスIL-6レセプターを認識する株をクローニングすることを特徴とするハイブリドーマの製造方法。

【請求項10】 請求項8に記載のハイブリドーマ、又は請求項9に記載の方法により製造されたハイブリドーマを培養し、該培養物からマウスIL-6レセプターを認識するモノクローナル抗体を採取することを特徴とする抗マウスIL-6レセプター抗体の製造方法。

【請求項11】 マウスIL-6レセプター抗原により哺乳類動物を免疫感作し、該動物からマウスIL-6レセプターを認識するポリクローナル抗体を採取することを特徴とする抗マウスIL-6レセプターポリクローナル抗体の製造方法。

【請求項12】 マウスIL-6レセプターに対するモノクローナル抗体を固定した固体支持体を分析検体と接触せしめることにより該分析検体中のマウスIL-6レセプターを該マウスIL-6レセプターに対するモノクローナル抗体を介して固体支持体に結合せしめ、そして固体支持体に結合したマウスIL-6レセプターを、固体支持体に固定したマウスIL-6レセプターに対するモノクローナル抗体と異なるマウスIL-6レセプターに対するモノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体を用いて測定することを特徴とするマウスIL-6レセプターの検出又は測定法。

【請求項13】 請求項12に記載の方法を実施するためのキットであって、マウスIL-6レセプターに対する抗体を含むことを特徴とするキット。

【請求項14】 請求項13に記載のマウスIL-6レセプターに対する抗体2種がRS13又はRS15あるいはこの両者であるキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はマウスIL-6レセプターと特異的に結合する抗体、並びにその製造方法及びその使用に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 インターロイキン-6 (BSF2/以下IL-6と略す) は、標的細胞上のIL-6レセプターと結合することにより、種々の重要な生理活性を誘導し、広く細胞の増殖分化に関与しているタンパク質である。さらに、IL-6の異常産生が種々の自己免疫疾患の病因因子である可能性が報告されている (岸本、平野、Ann. Rev. Immunol., 6, p485, 1988年参照)。IL-6の阻害剤として、IL-6作用を阻害するヒトIL-6レセプターに対する抗体が期待される。抗ヒトIL-6レセプター抗体を開発する過程で、IL-6作用を阻害する抗マウスIL-6レセプター抗体を、マウスIL-6過剰産生により自己免疫疾患の症状を呈するモデルマウスに投与して、その効果を調べることが必須となる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 従って、本発明はマウスIL-6レセプターに対する種々のタイプの抗体を提供しようとするものである。

【課題を解決するための手段】 上記の目的を達成するため、本発明者は、マウスIL-6レセプターと特異的に結合し得る抗マウスIL-6レセプター抗体；前記の性質を有するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ；マウスIL-6レセプター抗原により哺乳類を感作し、該哺乳類から免疫細胞をミエローマ細胞株と融合せしめ、そして該融合株からマウスIL-6レセプターを認識する株をクローニングすることを特徴とするハイブリドーマの製造方法；前記のハイブリドーマを培養し、該培養物からマウスIL-6レセプターを認識するモノクローナル抗体を採取することを特徴とする抗マウスIL-6レセプター抗体の製造方法；マウスIL-6レセプター抗原により哺乳類動物を免疫感作し、該動物からマウスIL-6レセプターを認識するポリクローナル抗体を採取することを特徴とする抗マウスIL-6レセプターポリクローナル抗体の製造方法；並びに抗マウスIL-6レセプターモノクローナル抗体2種から成るマウスIL-6レセプター測定方法並びに測定キットを提供する。

【0004】

【発明の具体的な説明】

1. マウスIL-6レセプターに対する抗体

本発明の抗体は、マウスIL-6レセプターを特異的に認識するものであり、これにはモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体が含まれる。本発明の抗体が認識するマウスIL-6レセプターとは、遺伝子工学的に生産されたマウス可溶性IL-6レセプター又は細胞膜上の天然型マウスIL-6レセプターのいずれかあるいは両方を意味する。モノクローナル抗体には、マウスIL-6あるいは

ヒトIL-6とマウスIL-6レセプターとの結合を競合的に阻害するものと、これを競合的に阻害しないものとが含まれる。前者の例としては、本発明のハイブリドーマRS13により産生されるRS13モノクローナル抗体が挙げられ、後者の例としてはハイブリドーマRS15により産生されるRS15モノクローナル抗体が挙げられる。

【0005】本発明の抗体の製造のために用いられる免疫原としては、遺伝子工学的に生産されたマウス可溶性IL-6レセプターを例示できるが、マウス細胞から精製された天然型のマウスIL-6レセプターやマウスIL-6レセプターを発現している細胞でもよい。ただし天然型のマウスIL-6レセプターやマウスIL-6レセプターを発現している細胞では、通常マウスIL-6レセプターの発現量が少ないために効率的な免疫原とは言えない。しかしながら、一旦マウスIL-6レセプターに対する抗体を手に入れば、これを用いて効率的に天然型のマウスIL-6レセプターを調製し、これを用いてさらに多様な抗体を製造することができる。

【0006】ハイブリドーマの作製も常法（免疫実験操作法、p447、日本免疫学会編、1975年参照）等に従って行うことができる。例えば、ラット等の哺乳類を免疫し、この動物から脾臓細胞を得、これを樹立されたミエローマ細胞と融合せしめる。ミエローマ細胞としては、ラットミエローマ細胞株YB2/0（大日本製薬）等が例示できる。モノクローナル抗体を製造するには、前記のようにしてクローニングされたハイブリドーマを培養し、培養上清からモノクローナル抗体を採取する。あるいは、前記ハイブリドーマを動物の腹くう内に移植し、腹水を得、これからモノクローナル抗体を単離することもできる。

【0007】ハイブリドーマ細胞上清中の抗体又は腹水中の抗体は、常法に従って、例えば硫酸アンモニウム塩析により濃縮することができ、さらにはアフィニティークロマトグラフィー、例えば可溶性マウスIL-6レセプターを固定化した担体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。ポリクローナル抗体の製造もまた常法に従って、例えば免疫原として上記のマウス可溶性IL-6レセプターをラット、ウサギ、モルモット、ヤギ等に免疫感作することによって行うことができる。

【0008】2. マウスIL-6レセプターの化学的測定法

マウスIL-6レセプターの化学的測定法とは、マウス血清、尿等に含まれるマウスIL-6レセプターの生理的濃度、マウス細胞を培養したときの培養上清中のマウスIL-6レセプター濃度を正確かつ迅速に測定することを目的としている。本発明の測定方法は、固体支持体に結合されたマウスIL-6レセプターに対する抗体に分析検体中のマウスIL-6レセプターを結合せしめ、この結合したマウスIL-6レセプターを常法により測定する。

【0009】固体支持体としては、マイクロタイタプレート、各種のビーズ状の例えばホリスチレン、ポリプロピレン等のプラスチック製、金属セラミック等の無機物質製の常用されている支持体を用いることができる。抗体の固定も常法に従って行う。例えば、PBS溶液に抗体を例えば、 $2\mu\text{g/ml}$ の濃度で溶解し、プレートのウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ加え、一晚静置させておけばよい。

【0010】固体支持体にマウスIL-6レセプターに対する抗体を介して結合したマウスIL-6レセプターは、常法により測定することができる。例えば、固体支持体へ結合させたマウスIL-6レセプターに対する抗体とは異なるマウスIL-6レセプターに対する抗体や、マウスIL-6レセプターに対するウサギ由来ポリクローナル抗体を結合せしめ、これらの抗体を認識する抗体で標識されているものを用いる。標識物質としては、アルカリフォスファターゼや西洋ワサビ・パーオキシダーゼ等の酵素、ビオチン等が例示できる。

【0011】

【実施例】以下本発明をさらに詳細に説明するために実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例1. マウスIL-6レセプターに対するラットモノクローナル抗体の作製

マウスIL-6レセプターに対するラットモノクローナル抗体を作製する目的で、免疫原として、特願平2-215886明細書に記載されているリコンビナント可溶性マウスIL-6レセプターを用いた。免疫は以下に行った。PBSに溶解した可溶性マウスIL-6レセプターを、ウイスターラット1匹あたり $100\mu\text{g}$ 、1週間に1回で計3回皮下に免疫した。

【0012】前記免疫されたラットからの脾細胞を、親株としてのラットミエローマ細胞株YB2/0と、ポリエチレングリコールを用いる通常の方法に従って融合せしめた。スクリーニングは以下のように行った。 $5\mu\text{g/ml}$ のマウスIL-6レセプターを含むPBS溶液を96穴のマイクロタイタプレートに1ウェル当り $100\mu\text{l}$ 加え、1晩4℃で放置した。洗浄後、1% BSA-PBS溶液を加え、2時間室温で放置した。

【0013】洗浄後、ハイブリドーマの培養上清($100\mu\text{l}$)を加え、2時間室温で放置した。コントロールにはハイブリドーマの培養上清の代わりにミエローマ細胞株YB2/0通常の培養上清を加えた。洗浄後、標識酵素としてアルカリフォスファターゼを結合した抗ラット免疫グロブリン抗体($2\mu\text{g/ml}$)を $100\mu\text{l}$ 加え、2時間室温で放置した。洗浄後、アルカリフォスファターゼ基質(1mg/ml)を $100\mu\text{l}$ 加え、37℃で約30分放置し、イムノリーダーで測定した。図1は、RS13及びRS15の培養上清を加えたときに発色が著しく増加していることを示す。これはRS13及びRS15が、抗マウスIL-6レセプタ

ー抗体を産生していることを示す。

【0014】実施例2. マウスIL-6レセプターに対するモルモットポリクローナル抗体の作製

PBSに溶解した可溶性マウスIL-6レセプターを、モルモット1匹あたり100 μ g、1週間に1回で計3回皮下に免疫した。1週間後全採血をし、通常の方法で抗体を精製した。

【0015】実施例3. 抗マウスIL-6レセプターモノクローナル抗体、及び抗マウスIL-6レセプターのポリクローナル抗体のIL-6中和活性の測定

M1細胞を1 $\times 10^5$ 個/ml、0.2ml/ウエルで、40ng/mlのヒトIL-6、及び種々の濃度のハイブリドーマの培養上清あるいは抗マウスIL-6レセプターポリクローナル抗体を加えた条件で培養した。60時間後、1ウエルあたり0.75 μ Ciのトリチウム標識されたチミジンを加え、6時間後細胞を集め、そして取り込まれた放射能を測定した。

【0016】第2図のデータは、RS15抗体がIL-6の作用を阻害しないのに対し、RS13抗体及び抗マウスIL-6レセプターポリクローナル抗体がIL-6の作用を阻害することを示している。これは、RS13抗体がM1細胞上のマウスIL-6レセプターに結合して、ヒトIL-6とマウスIL-6レセプターの結合を阻害したことによる。したがってRS13抗体が遺伝子工学的に作製されたマウスIL-6レセプターのみならず、マウス細胞上の天然型マウスIL-6レセプターとも結合することが示された。

【0017】実施例4. マウスIL-6レセプターの化学的測定法

2 μ g/mlのRS13抗体を含むPBSを96穴のマイクロタイタープレートに1ウエルあたり100 μ l加え、1晩4℃で放置した。PBS/0.05%Tween20により洗浄後、100 μ lの1%BSAを加え、2時間室温で放置した。PBS/0.05%Tween20により洗浄後、濃度既知の可溶性マウスIL-6レセプター(特願平2-215886)を1ウエルあたり100 μ l加え、2時間室温で放置した。

【0018】PBS/0.05%Tween20により洗浄後、2 μ

g/mlのビオチン化RS15抗体を含むPBSを1ウエルあたり100 μ l加え、2時間室温で放置した。PBS/0.05%Tween20により洗浄後、2500倍希釈したアビジンペルオキシダーゼを含むPBS/0.05%Tween20を加え37℃で1時間放置した。PBS/0.05%Tween20により洗浄後、ペルオキシダーゼ基質を加え、37℃で約30分放置後、415nmの発色を測定した。

【0019】第3図は、検体中のマウスIL-6レセプター濃度の増加に伴い強く発色すること、すなわち、本方法により検体中のマウスIL-6レセプター濃度が測定できることを示す。

【0020】

【発明の効果】本発明で提供されるマウスIL-6レセプターを特異的に認識するポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体及びマウスIL-6レセプターを化学的に測定する方法を用いることにより、自然状態では極めて微量にしか産生されないマウスIL-6レセプターの諸性質を解析することが可能になる。このことは、固体発生及び免疫機構の研究、さらにはそれらの成果に基づく治療薬診断薬等の開発等に大きな意義を持つ。さらに、本発明で提供されるIL-6の生物作用を阻害する抗体は、IL-6の異常産生が病因因子であると考えられている種々の自己免疫疾患の治療薬開発に有用である。

【0021】さらに、本発明の抗体は、マウスIL-6レセプターの免疫測定のためにも有用である。

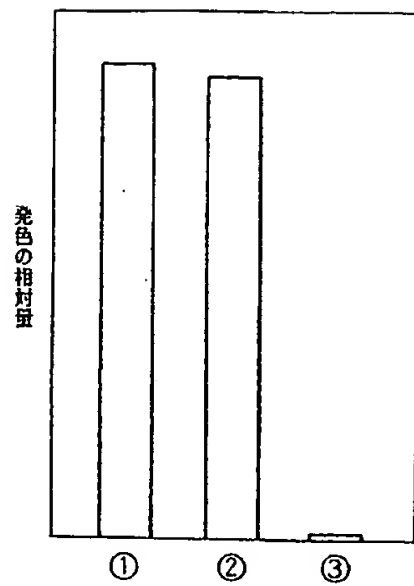
【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1に示す方法で測定したときの、①RS13、②RS15、③YB2/0の培養上清中の抗マウスIL-6レセプター抗体の相対量を示す。

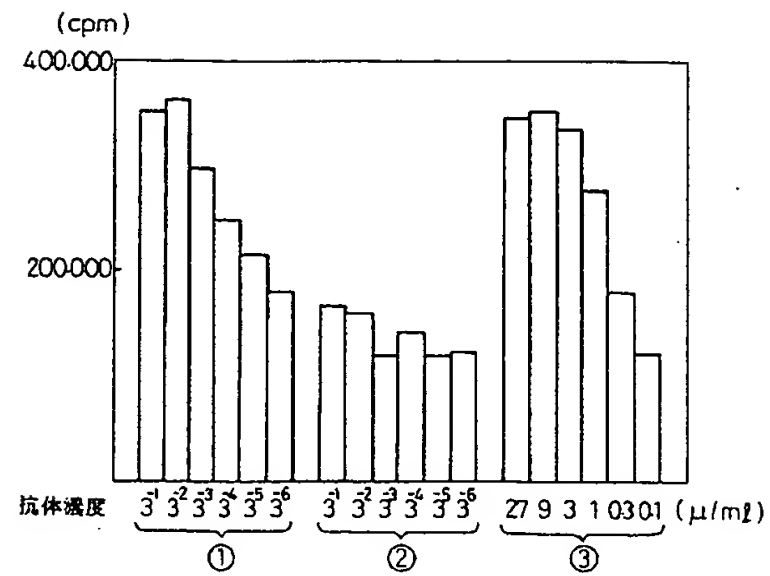
【図2】実施例3に示す方法で測定したときの①RS13、②RS15の培養上清中の抗マウスIL-6レセプター抗体及び③抗マウスIL-6レセプターポリクローナル抗体の、IL-6のM1細胞への分化誘導に対する阻害効果を示す。

【図3】実施例4に示す方法で測定したときの、プレートの発色を示す。

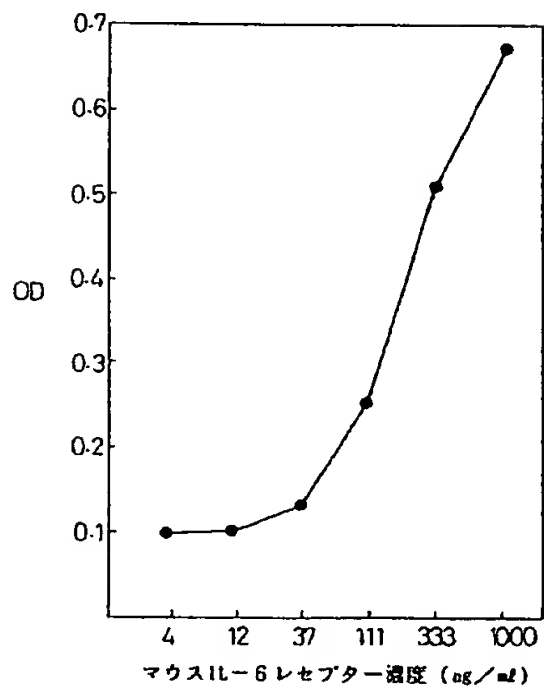
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

G 0 1 N 33/577

// A 6 1 K 39/395

C 0 7 K 15/06

C 1 2 N 15/06

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

識別記号

A B A

A B C

庁内整理番号

B 9015-2J

D 8413-4C

U 8413-4C

8619-4H

F I

技術表示箇所

(6)

特開平 5 - 2 1 1 8 8 8

(72) 発明者 岸本 忠三
大阪府富田林市中野町 3 - 5 - 31

(72) 発明者 鈴木 浩
神奈川県海老名市柏ヶ谷 967 - 1
(72) 発明者 保川 清
神奈川県相模原市相模大野 7 - 37 - 17